

· 药效与毒理学研究 ·

四君子汤对 IEC-6 细胞增殖相关指标及大鼠胃肠黏膜 c-Myc 表达的影响

涂小华, 杨欣, 杨光勇, 徐萌萌, 邓颖, 张庚鑫, 杜海洋, 王慧 (贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 观察四君子汤对 IEC-6 细胞(大鼠小肠上皮细胞)增殖, 多胺调控生长相关基因细胞周期检测点激酶 2(Checkpoint kinase 2, Chk2)、c-Myc 表达, 以及对大鼠胃肠黏膜 c-Myc 蛋白表达的影响。**方法** 采用 SD 大鼠制备空白血清及四君子汤含药血清; 无负荷细胞实验设空白对照组、腐胺组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及四君子汤含药血清低、中、高(5%、10%、20%)剂量组; α -二氟甲基鸟氨酸(α -difluoromethylornithine, DFMO)负荷细胞实验设空白对照组、DFMO 组($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、腐胺组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及四君子汤含药血清低、中、高(5%、10%、20%)剂量组; 动物实验将 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组(吡哆美辛组)及四君子汤低、高(5 、 $15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。采用 MTT 法检测 IEC-6 细胞增殖情况; qPCR 法检测细胞 Chk2、c-Myc mRNA 表达; Western Blot 法检测细胞 Chk2、p-Chk2、c-Myc 蛋白表达和大鼠胃肠黏膜的 c-Myc 蛋白表达。**结果** ①细胞实验: 与空白对照组比较, 10%、20% 四君子汤含药血清可促进给药 24 h 后 IEC-6 细胞的增殖($P<0.01$), 提高 p-Chk2 蛋白及 c-Myc mRNA/蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$); 5%、10%、20% 四君子汤含药血清可促进给药 48、72 h 后细胞增殖($P<0.01$), 促进 Chk2 mRNA/蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。与 DFMO 组比较, 5%、10%、20% 四君子汤含药血清可促进给药 48 h 后细胞增殖($P<0.01$), 提高 c-Myc mRNA/蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$); 10%、20% 四君子汤含药血清可促进给药 72 h 后细胞增殖($P<0.01$), 促进 Chk2 及 p-Chk2 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$); 20% 四君子汤含药血清可促进 Chk2 mRNA 表达($P<0.05$)。②动物实验: 与模型组比较, 四君子汤 5 、 $15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可上调模型大鼠胃黏膜及小肠黏膜 c-Myc 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 四君子汤可促进 IEC-6 细胞增殖, 其作用机制可能与影响多胺信号通路, 上调生长相关基因 Chk2、c-Myc 表达有关。四君子汤可提高胃肠黏膜损伤模型大鼠胃及小肠黏膜 c-Myc 蛋白表达水平。

关键词: 四君子汤; 胃肠黏膜损伤修复; 细胞增殖; 多胺; 细胞周期检测点激酶 2; c-Myc; IEC-6 细胞; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2022)02-0143-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.001

Effects of *Sijunzi* Decoction on IEC-6 Cell Proliferation Related Index and c-Myc Expression in Gastrointestinal Mucosa of Rats

TU Xiaohua, YANG Xin, YANG Guangyong, XU Mengmeng, DENG Ying, ZHANG Gengxin, DU Haiyang, WANG Hui (Faculty of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025 Guizhou, China)

Abstract: Objective To observe the effects of *Sijunzi* decoction on the proliferation of small intestinal epithelial cells (IEC-6), the expression of genes related to growth regulated by polyamine, including cell cycle checkpoint kinase 2

收稿日期: 2021-04-02

作者简介: 涂小华, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 益气健脾中药的作用机制及物质基础研究。Email: 277521161@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760864); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2017]173); 贵州中医药大学博士启动基金项目(20160035)。

(Chk2) and c-Myc, and c-Myc protein expression in gastrointestinal mucosa of rats. **Methods** The blank serum and serum containing *Sijunzi* decoction (SJZDS) were prepared from SD rats. The blank control group, putrescine group (PUT group, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), SJZDS 5%, 10% and 20% groups were set up in the unloaded cell experiment. The blank control group, α -difluoromethylornithine (DFMO) group, PUT group ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), SJZDS 5%, 10% and 20% groups were set up in DFMO loaded cell experiment. In animal experiment, SD rats were randomly divided into blank control group, indomethacin model group, *Sijunzi* decoction $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups. Proliferation of IEC-6 cells was detected by MTT assay, the mRNA expression of Chk2 and c-Myc was detected by real-time quantitative PCR; and Western Blot was used to detect the protein expression of Chk2, phosphorylated Chk2 and c-Myc. **Results** In the cell experiments, compared with blank control group, 10%, 20% SJZDS promoted cell proliferation at 24 h after administration ($P < 0.01$) and increased the phosphorylated Chk2 protein level and the mRNA and protein levels of c-Myc ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 5%, 10% and 20% SJZDS promoted cell proliferation at 48 h and 72 h after administration ($P < 0.01$), and enhanced the mRNA and protein expression of Chk2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with DFMO group, 5%, 10% and 20% SJZDS increased cell proliferation at 48 h after administration ($P < 0.01$), enhanced c-Myc mRNA and protein levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 10% and 20% SJZDS promoted cell proliferation at 72 h after administration ($P < 0.01$) and improved the protein expression of Chk2 and phosphorylated Chk2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 20% SJZDS increased Chk2 mRNA expression ($P < 0.05$). In animal experiments, compared with indomethacin model group, *Sijunzi* decoction ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) increased the protein expression of c-Myc in gastric mucosa and small intestinal mucosa ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** *Sijunzi* decoction can promote proliferation of IEC-6 cells, and the mechanism may be related to its influence on polyamine signaling pathway and up-regulation of growth-related genes Chk2 and c-Myc expression. *Sijunzi* decoction can increase the expression of c-myc protein in gastric and small intestinal mucosa of rats.

Keywords: *Sijunzi* decoction; gastrointestinal mucosal injury repair; cell proliferation; polyamine; cell cycle checkpoint kinase 2; c-Myc; IEC-6 cells; rats

胃肠黏膜对机体有特殊的保护作用,但黏膜屏障很脆弱,药物、酒精等因素均可对其造成损害,胃肠黏膜损伤为临床常见病变。多胺在维持胃肠黏膜屏障稳态中起着重要的调控作用,胃肠黏膜损伤后,其上皮细胞内多胺增加,激活多胺信号通路,启动细胞迁移、增殖及分化等黏膜修复过程^[1]。c-Myc是细胞核的一种转录因子,在小肠上皮细胞生长、分化及凋亡过程中发挥至关重要的调控作用^[2-3]。细胞周期检测点激酶 2(Checkpoint kinase 2, Chk2)广泛表达于小肠上皮细胞组织的细胞核中,对细胞周期起重要调控作用,且有研究^[4]发现,Chk2 依赖的人抗原 R(Human antigen R, HuR)磷酸化有利于维持肠上皮黏膜屏障的完整性。在胃肠黏膜损伤修复过程中,多胺能够调控生长相关基因 Chk2、c-Myc 表达而促进 IEC-6 细胞(大鼠小肠上皮细胞)增殖^[5-7]。

四君子汤源于宋代《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、甘草组成,是益气健脾法治疗脾虚证的代表方剂,临床常用于治疗消化性溃疡、溃

疡性结肠炎等属脾胃气虚者。近年来研究表明,四君子汤可促进大鼠胃肠黏膜损伤修复^[8-9],调控多胺信号通路促进黏膜损伤早期修复细胞的迁移过程^[10-11],还可促进 IEC-6 细胞增殖^[12]。本研究拟通过观察四君子汤对 IEC-6 细胞增殖,多胺信号通路 Chk2、c-Myc mRNA 及蛋白表达,以及大鼠胃肠黏膜损伤后 c-Myc 蛋白表达的影响,进一步探讨四君子汤促进小肠上皮细胞增殖的作用机制,以期四君子汤对胃肠黏膜损伤修复作用的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株 IEC-6 细胞(大鼠小肠上皮细胞),购自上海中乔新舟生物科技有限公司,货号:ZQ0783。

1.2 动物 健康 SD 大鼠 100 只,雌雄各半,清洁级,体质量 180~220 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014,动物质量合格证号:11072622011001638。大鼠适应性喂养 1 周后用于制备含药血清及动物实验。

1.3 药物及试剂 人参、茯苓、炒白术、炙甘草 4 种中药材均购自北京同仁堂(贵阳分店),经贵州中医药大学中药鉴定教研室丁宁副教授鉴定合格。胎牛血清,澳大利亚 Bovogen Biological 公司,批号:1606F;青霉素-链霉素双抗(批号:20200211)、高糖 DMEM(批号:20200720)、胰酶(批号:20200428),均购自赛澳美细胞技术(北京)有限公司; α -二氟甲基鸟氨酸(α -difluoromethylornithine, DFMO),德国 Calbiochem 公司,批号:3305986;腐胺(Putrescine, PUT),美国 Sigma 公司,批号:BCCB7540;吡啶美辛,上海源叶生物科技有限公司,批号:Y18M10C83262;MTT(批号:1015D058)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:20200602)、SDS-PAGE 凝胶试剂盒(批号:20200616),均购自北京索莱宝科技有限公司;RIPA 裂解液(批号:030220200527)、PMSF(货号:ST506)、5×蛋白上样缓冲液(货号:P0285),均购自上海碧云天生物技术公司;磷酸蛋白酶抑制剂,美国 APEX BIO 公司,批号:K10151133EE8D;ECL 化学发光液,美国 Bio-Rad 公司,货号:1705060;一抗 c-Myc(货号:18583S)、Chk2(货号:2662S)、 β -actin(货号:4970S),均购自美国 CST 公司;一抗 p-Chk2(批号:GR308417-23)、山羊抗兔 IgG 抗体(批号:GR3321256-7),均购自英国 Abcam 公司;RNA 提取试剂盒(批号:AJE2171A)、逆转录试剂盒(批号:AJ92011A)、PCR 荧光染料(批号:AJE1687A),均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.4 仪器 RE-5203 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Multifuge X1R 型离心机、3111 型 CO₂ 培养箱、Multiskan Go 酶标仪、Nanodrop Lite 超微量紫外可见分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DMi1 倒置相差显微镜,德国徕卡公司;LC-UP-400 型超声波细胞破碎仪,上海力辰仪器科技有限公司;TC-96/G/H(b)梯度 PCR 仪,杭州博日科技有限公司;CFX96 型荧光定量 PCR 仪、Power Pac™ Basic 电泳仪、ChemicDoc™ XRS+ 成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.5 四君子汤水提液及含药血清的制备 人参、茯苓、炙甘草、炒白术按等比例组方,药材剪碎,加 12 倍量纯水浸泡 2 h;文火煎煮提取 2 h,纱布过滤,收集滤液;同法再煎煮 1 次,合并滤液,旋转蒸发浓缩至含生药量为 1 g·mL⁻¹的四君子汤水提液。

将 20 只 SD 大鼠随机分为四君子汤组[灌胃四君

子汤水提液,给药剂量为 13 g·kg⁻¹·d⁻¹(按生药量计算),约为成人临床剂量的 20 倍]及空白组;给药体积 6.5 mL·kg⁻¹,每天灌胃 2 次,连续 4 d,第 4 天一次性灌胃全天剂量;空白组给予等容积的生理盐水。末次给药 2 h 后乙醚麻醉大鼠,腹主动脉采血;血样静置 2 h 后,以 1 580×g 离心 15 min,吸取上层血清,同组血清混匀;56 ℃灭活 30 min,以 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后分装,即得空白血清及四君子汤含药血清(SJZDS),-20 ℃冰箱保存,备用。临用前以含 0.5%胎牛血清的 DMEM 将空白血清稀释成含 20%空白血清培养基,将四君子汤含药血清分别稀释成 5%、10%、20% 四君子汤含药血清培养基备用,以空白血清补足至各组血清总含量为 20%。

1.6 细胞培养、分组及 MTT 法检测细胞增殖^[13] 参考相关研究^[10]方法培养细胞,将 IEC-6 细胞接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,细胞密度为 5×10⁴·mL⁻¹,培养基为含 5%胎牛血清的 DMEM,37 ℃下培养 24 h;弃去培养液,加入无血清的 DMEM 进行血清饥饿 24 h 后,进行以下实验。①无负荷实验:将细胞分为 5 组,即空白对照组(每孔加入 200 μ L 20%空白血清培养基)、腐胺组(阳性对照组,加入 200 μ L 含终浓度 10 μ mol·L⁻¹腐胺的 20%空白血清培养基),以及四君子汤含药血清低、中、高剂量组(分别加入 200 μ L 5%、10%、20% 四君子汤含药血清培养基)。②DFMO 负荷实验:除空白对照组外,其余各组均加入含终浓度 2.5 mmol·L⁻¹的 DFMO;并增加 DFMO 组,加入含终浓度 2.5 mmol·L⁻¹ DFMO 的 20%空白血清培养基。

上述各组分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg·mL⁻¹),37 ℃下避光孵育 4 h 后,弃去培养液;各孔加入 150 μ L DMSO,室温下振荡 10 min,采用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光度(A)值,计算:细胞增殖率(%)=(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。每组设置 5 个复孔,实验重复 3 次。

1.7 动物分组、胃肠黏膜损伤模型^[14]复制及给药 胃黏膜损伤实验:将 40 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组(吡啶美辛组)及四君子汤低、高剂量组(5、15 g·kg⁻¹,按生药量计算),各 10 只。受试药组灌胃给予相应剂量四君子汤水提液,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,每天 1 次,连续给药 4 d,空白对照组及模型组给予等容积的生理盐水。造模前大鼠禁食不禁水 24 h,末次给药 1 h 后,空白对照组皮下注射生理盐水,其余各组皮下注射 40 mg·kg⁻¹吡啶美辛进行模型复制;

7 h 后处死大鼠, 摘除整胃, 沿胃大弯剪开, 用冰生理盐水冲洗干净内容物, 冰上刮取胃黏膜并置于 -80°C 保存, 备用。

小肠黏膜损伤实验: 分组及给药方法同胃黏膜损伤实验; 第 4 天给药 1 h 后, 空白对照组皮下注射生理盐水, 其余各组皮下注射吡啶美辛 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行模型复制, 模型复制与给药同时继续进行 4 d; 末次给药后, 禁食不禁水 24 h, 次日处死大鼠; 沿胃幽门向下 20 cm, 取中下段空肠(损伤较明显)约 10 cm, 剪开小肠, 用冰生理盐水清洗干净内容物, 冰上刮取小肠黏膜并置于 -80°C 保存, 备用。

1.8 qPCR 法检测细胞 Chk2、c-Myc mRNA 表达

IEC-6 细胞接种于 6 孔板, 细胞密度为 $8\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔 2.5 mL, 血清饥饿及给药方法同“1.6”项, 培养基体积为 2.5 mL。给药培养 48 h 后, 采用 Takara RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 检测 RNA 含量和纯度($A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.1$); 采用 Takara 逆转录试剂盒进行逆转录反应, 反应条件为: 37°C 15 min, 85°C 5 s。在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应, 反应体系为 25 μL , 反应条件: 预变性 95°C 30 s, 变性 95°C 5 s, 退火 60°C 30 s, 共 40 个循环。扩增反应后分析熔解曲线及扩增曲线, 计算 Ct 值; 以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各组间 Chk2、c-Myc mRNA 表达水平差异。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

引物名称	引物序列	产物长度/bp
β -actin	Forward primer: 5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3'	71
	Reverse primer: 5'-CCAGCCTGGATGGCTACGT-3'	
c-Myc	Forward primer: 5'-TCCTCCCGCTGACCAACATC-3'	114
	Reverse primer: 5'-CTGTCTGGCTCGCAGATTGTAAG-3'	
Chk2	Forward primer: 5'-CACAGTCTCAAGCGGCTTCAG-3'	122
	Reverse primer: 5'-GGAGGACTGGCTGGAGGATGG-3'	

1.9 Western Blot 法检测细胞 Chk2、p-Chk2、c-Myc

蛋白表达和大鼠胃肠黏膜的 c-Myc 蛋白表达 细胞接种、血清饥饿及给药方法同“1.8”项, 给药培养 48 h 后, 刮取细胞并加入含 1% PMSF 及磷酸蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 超声破碎细胞; 胃肠黏膜组织则称定质量, 加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液匀浆并超声破碎细胞; 4°C 下以 $16\ 060\times g$ 离心 15 min 后, 采用 BCA 法测定上清液蛋白浓度。加入上样缓

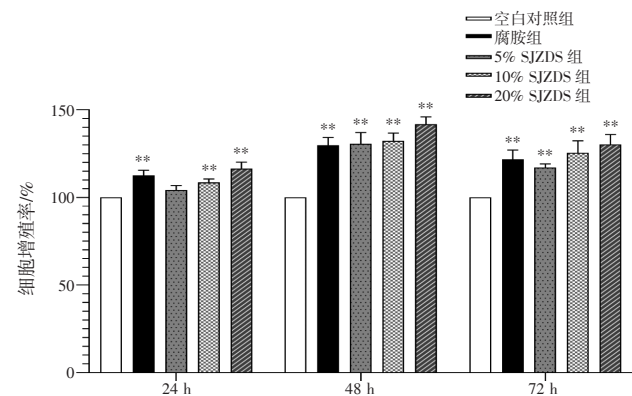
冲液制备样品, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 将胶及 PVDF 膜制备成“三明治”, 放入电转液中恒流 300 mA 转膜 90 min; 将膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h; 加入一抗 β -actin(1:1 000)、Chk2(1:1 000)、p-Chk2(1:1 000)、c-Myc(1:1 000)兔抗单克隆抗体, 4°C 下孵育过夜; 洗膜 3 次后, 加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000), 室温下孵育 1 h; 洗膜 3 次后, 进行 ECL 显影并采用 ChemiDoc™ XRS⁺ 成像仪扫描成像; 采用 Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 作为内参蛋白, 计算目的蛋白相对表达量。细胞实验每组设 3 个复孔, 实验独立重复 3 次。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞增殖的影响

无负荷实验结果见图 1。与空白对照组比较, 给药 24 h 后, 腐胺及 10%、20% 四君子汤含药血清均可提高 IEC-6 细胞的增殖率($P < 0.01$), 给药 48、72 h 后, 腐胺及 5%、10%、20% 四君子汤含药血清均可提高 IEC-6 细胞的增殖率($P < 0.01$)。



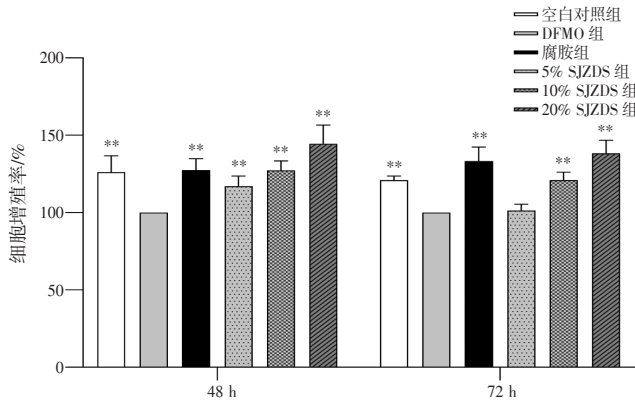
注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

图 1 四君子汤含药血清(SJZDS)对 IEC-6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 1 Effect of serum containing Sijunzi decoction on proliferation of IEC-6 cells($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

DFMO 负荷实验结果见图 2。与空白对照组比较, 给药 48、72 h 后, 多胺合成抑制剂 DFMO 可降低 IEC-6 细胞的增殖率($P < 0.01$); 与 DFMO 组比较, 给药 48 h 后, 腐胺及 5%、10%、20% 四君子汤含药血清均可拮抗 DFMO 所致的 IEC-6 细胞增殖率

降低($P < 0.01$)；给药 72 h 后，腐胺及 10%、20% 四君子汤含药血清均可拮抗 DFMO 所致的 IEC-6 细胞增殖率降低($P < 0.01$)。结果表明，四君子汤含药血清可促进 IEC-6 细胞增殖，且该作用可能与对多胺的影响有关。



注：与 DFMO 组比较，** $P < 0.01$

图 2 四君子汤含药血清(SJZDS)对 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)负荷下 IEC-6 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effect of serum containing *Sijunzi* decoction on proliferation of IEC-6 cells loaded by α -difluoromethylornithine ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

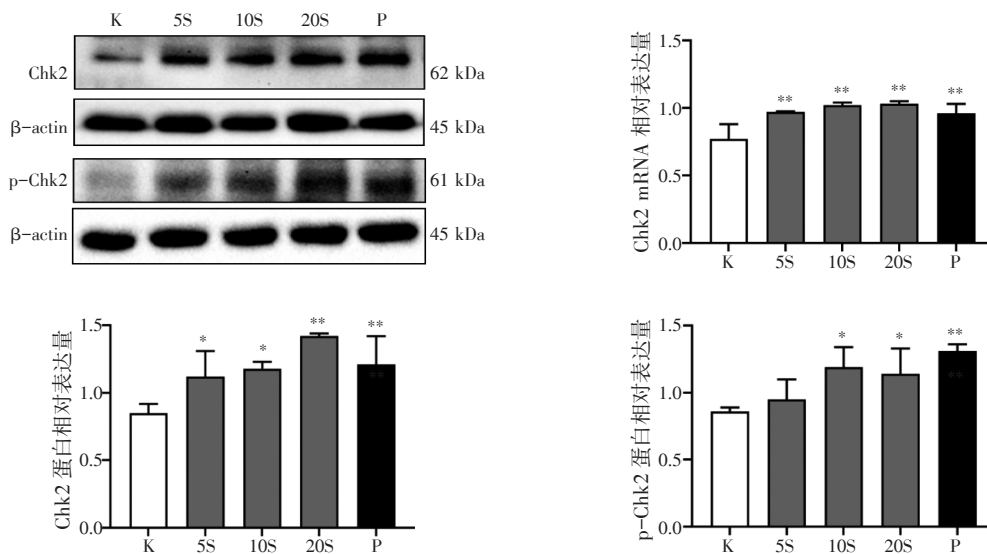
2.2 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞 Chk2、p-Chk2 蛋白表达及 Chk2 mRNA 表达的影响 无负荷实验结果见图 3。与空白对照组比较，腐胺及 5%、10%、20% 四君子汤含药血清均可促进 IEC-6 细胞

Chk2 mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)，腐胺及 10%、20% 四君子汤含药血清均可促进 IEC-6 细胞 p-Chk2 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

DFMO 负荷实验结果见图 4。与空白对照组比较，DFMO 对 IEC-6 细胞 Chk2、p-Chk2 蛋白表达及 Chk2 mRNA 表达均有抑制作用($P < 0.01$)；与 DFMO 组比较，腐胺及 20% 四君子汤含药血清可拮抗 DFMO 所致的 IEC-6 细胞 Chk2 mRNA 表达下调($P < 0.05$)，腐胺及 10%、20% 四君子汤含药血清可拮抗 DFMO 所致的 IEC-6 细胞 Chk2、p-Chk2 蛋白表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，四君子汤含药血清可上调 IEC-6 细胞 Chk2、p-Chk2 蛋白表达及 Chk2 mRNA 表达，且该作用可能与对多胺的影响有关。

2.3 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达的影响 无负荷实验结果见图 5。与空白对照组比较，腐胺及 10%、20% 四君子汤含药血清均可提高 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

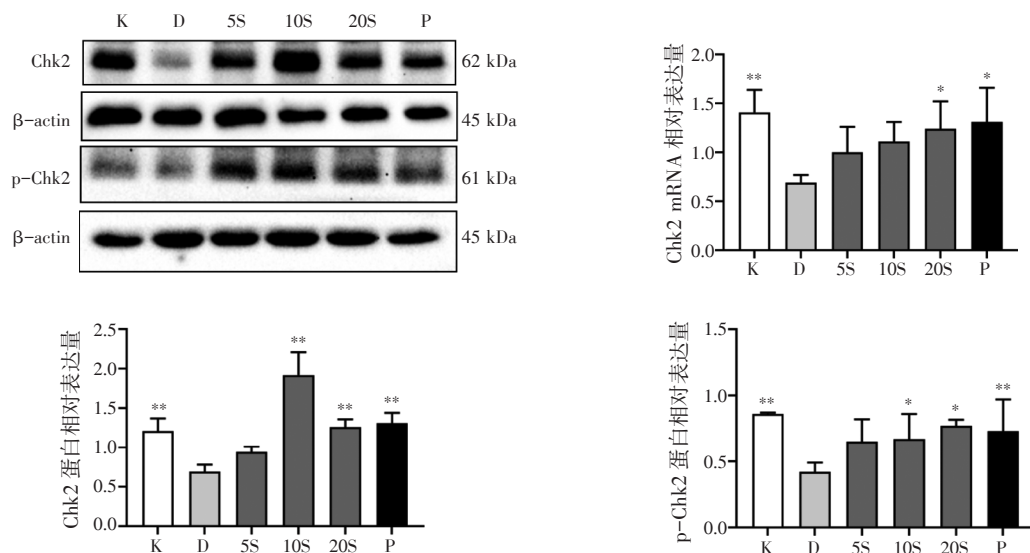
DFMO 负荷实验结果见图 6。与空白对照组比较，DFMO 可抑制 IEC-6 细胞的 c-Myc mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与 DFMO 组比较，腐胺及 5%、10%、20% 四君子汤含药血清可拮抗 DFMO 所致的 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达有上调作



注：K：空白对照组；5S：5% 四君子汤含药血清组；10S：10% 四君子汤含药血清组；20S：20% 四君子汤含药血清组；P：腐胺组。与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 3 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞 Chk2 mRNA、蛋白表达及 p-Chk2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

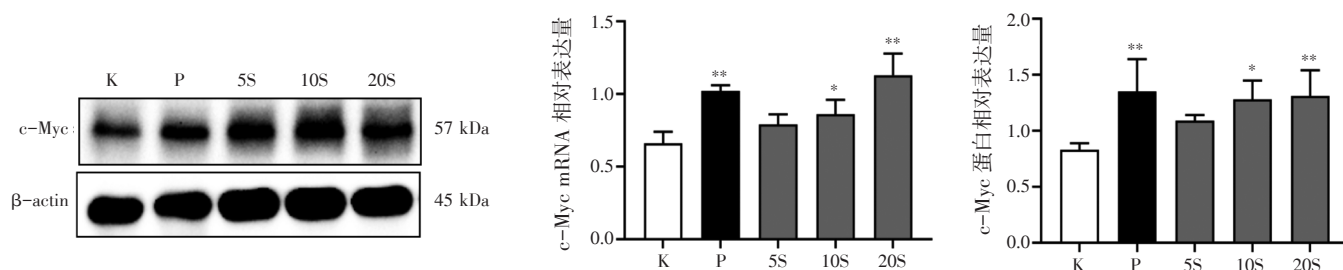
Figure 3 Effect of serum containing *Sijunzi* decoction on mRNA and protein expression of Chk2 and expression of phosphorylated Chk2 of IEC-6 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: K: 空白对照组; D: DFMO 组; 5S: 5%四君子汤含药血清组; 10S: 10%四君子汤含药血清组; 20S: 20%四君子汤含药血清组; P: 腐胺组。与 DFMO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 四君子汤含药血清对 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)负荷下 IEC-6 细胞 Chk2、p-Chk2 蛋白表达及 Chk2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

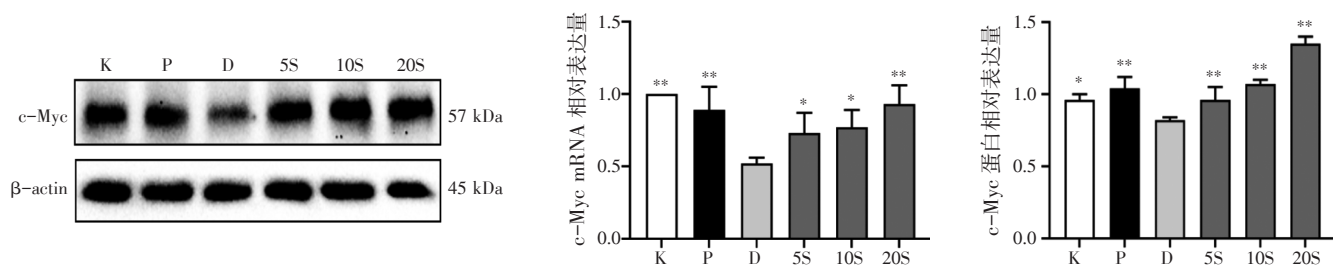
Figure 4 Effect of serum containing *Sijunzi* decoction on protein expression of Chk2 and p-Chk2 and mRNA expression of Chk2 of IEC-6 cells loaded by α -difluoromethylornithine($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: K: 空白对照组; P: 腐胺组; 5S: 5%四君子汤含药血清组; 10S: 10%四君子汤含药血清组; 20S: 20%四君子汤含药血清组。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 5 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of serum containing *Sijunzi* decoction on c-Myc mRNA and protein expression of IEC-6 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: K: 空白对照组; P: 腐胺组; D: DFMO 组; 5S: 5%四君子汤含药血清组; 10S: 10%四君子汤含药血清组; 20S: 20%四君子汤含药血清组。与 DFMO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

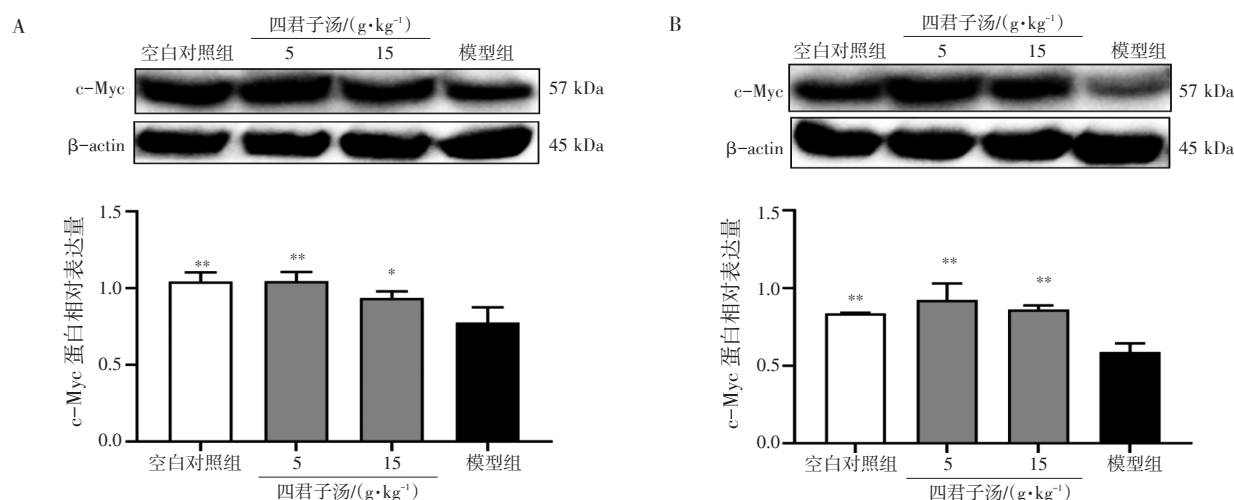
图 6 四君子汤含药血清对 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)负荷下 IEC-6 细胞 c-Myc mRNA 及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effect of serum containing *Sijunzi* decoction on c-Myc mRNA and protein expression of IEC-6 cells loaded by α -difluoromethylornithine($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

用,且该作用可能与对多胺的影响有关。

2.4 四君子汤对胃肠黏膜损伤模型大鼠胃肠黏膜 c-Myc 蛋白表达的影响 结果见图 7。与空白对照组比较,模型组大鼠的胃黏膜及小肠黏膜的 c-Myc 蛋白表达均明显下调($P < 0.01$);与模型组比较,

5、15 g·kg⁻¹ 四君子汤水提液可明显上调胃肠黏膜损伤模型大鼠的胃及小肠黏膜的 c-Myc 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,四君子汤对吡啶美辛损伤的大鼠胃肠黏膜 c-Myc 蛋白表达有上调作用。



注: A. 胃黏膜 c-Myc 蛋白表达; B. 小肠黏膜 c-Myc 蛋白表达。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 7 四君子汤水提液对各组大鼠胃肠黏膜 c-Myc 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 7 Effect of *Sijunzi* decoction water extract on c-Myc protein expression in gastrointestinal mucosa of rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3 讨论

四君子汤是临床常用的益气健脾基础方,方中人参为君药,甘温益气、健脾养胃;白术为臣药,健脾燥湿,加强益气助运之力;茯苓甘淡为佐药,健脾渗湿,苓术相配,则加强健脾祛湿之功;炙甘草为使药,益气和中,调和诸药;四药配伍,共奏益气健脾之功。益气健脾是脾虚证的主治法则,该方常用于治疗慢性胃炎、胃溃疡^[15]等属脾虚证者。非器质性病变的脾虚患者可见胃肠黏膜损伤的病理改变。多胺(包括腐胺、精胺及精胍)对上皮细胞迁移、细胞增殖等黏膜修复过程均有重要调控作用。本课题组前期体外研究^[10-11]表明,四君子汤多糖可影响多胺信号通路 Ca²⁺调控而促进小肠上皮细胞迁移;另有体内研究^[18-19]表明,四君子汤可修复大鼠胃肠黏膜损伤,其作用机制与影响多胺信号通路 Ca²⁺调控以及黏附连接蛋白有关。上皮细胞增殖是黏膜损伤修复的重要环节之一,但四君子汤对该过程的调控作用尚未明确。故本研究选择应用较为广泛的正常小肠上皮细胞(IEC-6 细胞,未分化、非致瘤性)建立体外胃肠黏膜损伤模型^[1],并采用 MTT 法检测上皮细胞增殖情况。结果发现,给药 48、72 h 后,四君子汤含药血清可促进正常小肠上皮细胞增殖,其作用与

腐胺相似;四君子汤含药血清还可拮抗 α-二氟甲基鸟氨酸(DFMO,多胺合成抑制剂)所引起的细胞增殖抑制。结合前期研究结果表明,四君子汤可能通过对多胺的影响来促进小肠上皮细胞迁移及细胞增殖等黏膜损伤的修复过程。

近年来研究^[7]发现,在 IEC-6 细胞中,多胺可通过激活 c-Myc 来提高 E-钙黏蛋白的转录水平,从而发挥其保护上皮黏膜屏障的功能,而多胺合成抑制后则同时抑制 c-Myc 表达。多胺可通过促进细胞周期检测点激酶 2(Chk2)依赖的 HuR 磷酸化而提高 c-Myc 表达;反之,多胺合成抑制则降低 Chk2 表达,从而抑制 c-Myc 表达^[6]。另外,磷酸鞘氨醇通过调控细胞增殖而发挥其维持肠上皮黏膜完整性的作用,过表达鞘氨醇激酶 1(磷酸鞘氨醇的合成限速酶)可增强 Chk2 表达并提高 HuR 磷酸化,从而上调 c-Myc 表达,最终促进 IEC-6 细胞增殖^[3]。上述研究表明,上调 Chk2 及 c-Myc 表达可促进小肠上皮细胞增殖,多胺为其重要调控因素之一。本研究在 IEC-6 细胞实验中发现,给药 48 h 后,四君子汤含药血清可上调 Chk2、c-Myc mRNA 及蛋白表达,且可提高 Chk2 活性(p-Chk2 蛋白表达的高低可反映 Chk2 活性, p-Chk2 蛋白表达升高则说明 Chk2 活性提高);

多胺合成抑制剂 DFMO 对 Chk2、c-Myc mRNA/蛋白表达以及 Chk2 活性均有抑制作用；四君子汤含药血清可拮抗 DFMO 所诱导的 Chk2、c-Myc mRNA/蛋白表达下调及 Chk2 活性降低。另外，本课题组还发现四君子汤可提高小肠上皮细胞增殖过程中细胞内多胺(腐胺及精脞)的含量(将另文发表)。综合上述研究结果表明，四君子汤可通过调控多胺信号通路 Chk2 及 c-Myc 表达而促进小肠上皮细胞增殖。

四君子汤水提液及多糖对吡啶美辛所致的胃肠黏膜损伤有较好的防治作用^[14]。为明确在胃肠黏膜损伤修复过程中四君子汤对 c-Myc 蛋白表达的调控作用，本研究采用不同剂量吡啶美辛及不同造模时间成功复制了胃黏膜及小肠黏膜损伤大鼠模型。结果发现，吡啶美辛对胃黏膜及小肠黏膜 c-Myc 蛋白表达均有抑制作用，而四君子汤水提液则可逆转吡啶美辛对 c-Myc 蛋白表达的抑制作用，进一步表明四君子汤可通过上调 c-Myc 表达而促进胃肠黏膜损伤修复。

综上所述，多胺合成抑制剂 DFMO 可下调 Chk2、c-Myc mRNA 及蛋白表达并降低 Chk2 活性，进而抑制细胞增殖，而四君子汤能够拮抗 DFMO 的抑制作用，通过上调 Chk2、c-Myc mRNA 及蛋白表达及提高 Chk2 活性来促进小肠上皮细胞增殖。结合前期研究结果表明，四君子汤可能通过调控多胺信号通路钾通道蛋白、钙离子上下游指标等促进 IEC-6 细胞迁移^[10-11]，并通过影响多胺信号通路相关指标来调控小肠上皮细胞增殖过程，是其促进胃肠黏膜损伤修复的作用机制之一，但其药效物质基础尚未明确，还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] GAO J H, GUO L J, HUANG Z Y, et al. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract[J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64(6): 681-693.
- [2] LIU L, RAO J N, ZOU T, et al. Activation of Wnt3a signaling stimulates intestinal epithelial repair by promoting c-Myc-regulated gene expression[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(1): 277-285.
- [3] JIANG P, SMITH A D, LI R, et al. Sphingosine kinase 1 overexpression stimulates intestinal epithelial cell proliferation through increased c-Myc translation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(12): 1187-1197.
- [4] YU T X, WANG P Y, RAO J N, et al. Chk2-dependent HuR phosphorylation regulates occludin mRNA translation and epithelial barrier function[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(19): 8472-8487.
- [5] LIU L, GUO X, RAO J N, et al. Polyamine-modulated c-Myc expression in normal intestinal epithelial cells regulates p21Cip1 transcription through a proximal promoter region[J]. Biochem J, 2006, 398(2): 257-267.
- [6] LIU L, RAO J N, ZOU T, et al. Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(23): 4885-4898.
- [7] LIU L, GUO X, RAO J N, et al. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(4): 801-810.
- [8] SHI Y X, ZHU H B, LI R L, et al. Effect of polysaccharides from *Sijunzi* decoction on Ca²⁺ related regulators during intestinal mucosal restitution[J]. Phytomedicine, 2019, 58: e152880.
- [9] 王东旭, 李茹柳, 朱易平, 等. 从多胺及细胞连接蛋白角度探讨四君子汤防治胃黏膜损伤的作用机制[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2886-2892.
- [10] 涂小华, 李茹柳, 邓娇, 等. 四君子汤多糖对IEC-6细胞迁移、钾通道蛋白及膜电位的影响[J]. 中药材, 2016, 39(4): 856-862.
- [11] 涂小华, 李茹柳, 邓娇, 等. 四君子汤多糖对小肠上皮细胞迁移多胺信号通路钙离子调控的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1665-1673.
- [12] 宋厚盼, 李如意, 魏艳霞, 等. 四君子汤含药血清上调c-Myc表达促进小肠上皮细胞迁移和增殖[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 154-159.
- [13] 时玉霞, 李茹柳, 邓娇, 等. 实时细胞分析法建立小肠上皮细胞生长实验模型[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2): 290-294.
- [14] 王东旭. 四君子汤通过影响多胺以防治胃肠黏膜损伤的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [15] 霍涌波, 尚国涛, 任利. 四君子汤治疗脾胃气虚型胃溃疡合并功能性消化不良的效果观察[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3352-3354.

(编辑: 邹元平)